Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)
ANNO LXVI - FASC. II-III — MARZO-GIUGNO 1912.

DI UN NUOVO METODO DI INDAGINE MICROSCOPICA DEGLI ORGANI VIVENTI.

DOTT. M. GHIRON

(Comunicazione fatta all'Accademia Medico-Fisica Fiorentina
nell'Adunanza del 14 Marzo 1912).

Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)
ANNO LXVI - FASC. II-III — MARZO-GIUGNO 1912.

DI UN NUOVO METODO
DI INDAGINE MICROSCOPICA DEGLI ORGANI VIVENTI.

DOTT. M. GHIRON

(Comunicazione fatta all'Accademia Medico-Fisica Fiorentina
nell'Adunanza del 14 Marzo 1912).

Ghiron dott. M. — *Di un nuovo metodo di indagine microscopica degli organi viventi.*

Nota l'*Ehrlich* (1) nell' enciclopedia di tecnica microscopica, che dopo le pubblicazioni del *Kühne* (2) sui movimenti dei granuli di zimogeno del pancreas, le ricerche sugli organi viventi, di animali a sangue caldo, sono rimaste del tutto trascurate.

Eppure oggi, coi nuovi mezzi di cui si dispone, sarebbero feconde di buoni risultati, perchè coll' usare di pezzi fissati e inclusi, non sempre vien tolto il dubbio che il parenchima sia stato in qualche parte modificato dai reagenti, e si rende più difficile l' opera di seguire le variazioni della circolazione sanguigna e dell' attività nelle cellule funzionanti. Questo studio diverrebbe forse più agevole, e sarebbe possibile controllare in parte, dati raccolti con altri metodi, se si potesse riprendere l' esperimento del *Kühne* ed estenderlo agli altri organi addominali.

Ma è necessario cercare un' altra via, da quella che egli ha seguìto, per osservare l' interno dei tessuti.

Il pancreas, per la sua sottigliezza e scarsa irrigazione, in alcune posizioni, può venire osservato per trasparenza; mentre il fegato, i reni, la milza, ecc., sono opachi e non è possibile altra illuminazione, se non quella fatta di lato e dal disopra.

Esiste a questo proposito una breve nota del *Heuter* (3), che accenna di aver usato di raggi cadenti dall' alto, per studiare la circolazione del labbro. Ma per quanto egli dimostri di aver concepito non poche speranze sulla possibilità di una pratica attuazione di questa idea, ben presto la lasciò cadere, nè mi consta che sia stata da altri raccolta.

Evidentemente la luce del giorno o quella di una lampada a gaz, non possiedono una intensità sufficiente per penetrare in corpi poco trasparenti, e d' altra parte, egli non potè usare che un piccolo ingrandimento (52 diametri), troppo inferiore alle necessità di uno studio sulla fisiologia microscopica degli organi.

---

(1) *Enzyklopädie der Mikroscopischen Technik*. Berlin, Hirschwald, 1910.

(2) Kühne-Lea, *Untersuchungen aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg*, Bd. 2, H. 4, 1882.

(3) Heuter, *Die Cheilo-Angioskopie*. (Centralblatt für die Medizinischen Wissenschaften, n. 13-14, 1879).

Per questo sarà conveniente, innanzi tutto, disporre di una forte sorgente luminosa, poi dare ai raggi quella tale inclinazione, che procuri il miglior rendimento, e infine concentrarli nel modo e alla distanza, che le condizioni di esperimento dimostrino più utile.

Con questi principii mi sono costruito un apparecchio che consta:

a) Di una lampada elettrica di grande intensità luminosa (può usarsi una lampada Nerst a tre filamenti, che dà una luce bianca e senza oscillazioni). Sarà necessario porre la lampada dentro una cassetta a doppia parete, che protegga l' osservatore dal calore e dalla luce. Nella parete anteriore, avrà un' apertura cicolare del diametro di 10-15 cm.

b) Di una vasca di vetro a circolazione d' acqua, posta nell'apertura della cassetta, per assorbire i raggi calorifici.

c) Di un sistema di lenti convergenti, a fuoco corto (10-20 cm.) poste sul cammino dei raggi.

d). Di un microscopio.

La cassetta contenente la lampada, e le lenti sono inclinate per modo, che il fuoco dei raggi arrivi sul tavolino del microscopio, con un angolo di circa 20 gradi.

La distanza delle lenti dal microscopio, è regolata in modo, che l' immagine dei filamenti della lampada, venga proiettata sull' organo da osservarsi, e precisamente nella posizione di questo, che è messo a fuoco, rispetto al microscopio.

Si può così spiegare il principio su cui si fonda l' uso dell' apparecchio: Se alcuni oggetti sono immersi in un mezzo trasparente o quasi, e vengono illuminati per mezzo di un fascio di raggi, che penetri dentro al mezzo suddetto, un osservatore posto al di fuori, li distinguerà coi loro contorni e coi loro colori caratteristici.

Nell' osservazione consueta al microscopio, la illuminazione si fa dalla parte inferiore del preparato, e i raggi che penetrano in esso, ne illuminano, per trasparenza, le particolarità.

È peraltro evidente che, anche illuminando lateralmente, per effetto di molteplici riflessioni e rifrazioni, che devono certamente avvenire a causa delle numerose discontinuità del tessuto stesso, le particolarità di tessuti trasparenti negli strati superficiali, riusciranno osservabili, in parte per trasparenza e se ne ottengono le colorazioni, e in parte per riflessione ottenendo gli effetti di contorno.

Tutto sta dunque nel poter disporre d' un fascio di raggi luminosi, di sufficiente intensità. Questo, penetrando come si è detto attraverso i primi strati del tessuto, metterà in rilievo le diversità di

struttura, di colorazione, in maniera molto analoga a quanto succede nell' ordinaria osservazione dei preparati microscopici.

Naturalmente si dovrà limitare lo studio agli strati piu superficiali dei tessuti.

Trattandosi di organi aventi una superficie liscia, e che possa dar luogo a riflessione superficiale, bisogna evitare che il cono di luce riflessa dalla superficie esterna dell' organo stesso, entri nel microscopio, giacchè in questo caso l'occhio rimane abbagliato, e non si nota più che una macchia luminosa, che maschera le particolarità che risulterebbero dall' osservazione degli strati più profondi.

Questa osservazione è di grande importanza perchè è soltanto regolando opportunamente la inclinazione dei raggi che colpiscono l' organo, che si può ottenere che l' immagine che si va a formare nel microscopio, sia data quasi esclusivamente da raggi, che penetrati negli strati più profondi, escono dall' organo, dopo aver attraversato (illuminando quindi per trasparenza) gli strati più superficiali, rendendo così l' osservazione perfettamente paragonabile, con quella fatta di consueto, con illuminazione per trasparenza.

L' esperienza ha confermato pienamente questa previsione; e ho potuto con questo metodo, studiare nell' organo vivente molte particolarità della sua funzione.

Ho adoperato come animale da studio, a preferenza del *mus musculus,* perchè la piccola mole agevola le condizioni di esperimento e gli organi stessi sono più trasparenti che negli animali di dimensioni maggiori.

Per mantenere il tessuto in osservazione, in condizioni che più si avvicinino alle fisiologiche, uso della tecnica seguente:

L' animale fissato a un' assicella, è narcotizzato con cloralosi; pratico un' incisione cutanea di due cm. e un occhiello negli strati muscolari e nel peritoneo, di mezzo cm. collocandovi sopra un vetrino coprioggetti rotondo, che mantengo a posto con una sutura, a borsa di tabacco, della cute.

Infine l' animale viene messo in una camera calda, che contiene pure il microscopio.

Osservando così a volta a volta i varii organi, ho potuto avere un' immagine ben chiara e distinta della circolazione, ad esempio nelle lacune spleniche, dove pel lentissimo corso del sangue, si può seguire il flusso e reflusso dell' onda sanguigna corrispondente all' inspirazione ed espirazione. Nel fegato ove, come da un preparato vivente, si può osservare la caratteristica distribuzione dei capillari epatici, sanguigni

e biliari. Se poi iniettavo per via sottocutanea liquidi colorati, come bleu di metilene, di tuloidina, nigrosina, ne osservavo la presenza nei linfatici e parenchima delle ghiandole sotto forma di granuli.

Data l' importanza della funzione dei tubuli contorti, e i varii problemi che si connettono alla secrezione renale, mi è parso non privo di interesse l' iniziare appunto da essa le mie ricerche, e studiarla in rapporto a quei liquidi coloranti, che sono stati l' obbiettivo di molti sperimentatori dall' *Heidenhain* a oggi.

Ponendo dunque sotto all' obbiettivo una porzione di rene, si vede disegnarsi un elegante reticolo rosso a maglie rettangolari, o poligonali, costituito dai capillari paralleli ai tubuli, che percorrono alla superficie un tratto più o meno lungo, quasi sempre rettilineo. Un' opportuna inclinazione di luce rende visibili i corpuscoli rossi circolanti come tanti punti luminosi, se i raggi riflessi coincidono coll' asse ottico del microscopio; come globuli rossi, se l' inclinazione del raggio incidente è diverso, e vengono percepiti per la luce da essi diffusa. Seguendo la direzione della corrente, si vede che gli eritrociti, percorso uno dei tratti della rete vasale, scompaiono generalmente in quel capillare, che si porta negli strati più profondi.

È raro che percorrano due tratti superficiàli. Questo fatto è in apparente contradizione coll' esistenza di un reticolo capillare corticale dimostrato dagli anatomici, con fini iniezioni di varie sostanze. Ma si possono accordare tra di loro il fatto anatomico e il fatto fisiologico, pensando che il plasma sanguigno, deve sempre scegliere quella via, ove la resistenza è minore ed è maggiore la forza aspirante delle vene, ossia continuare in quel capillare. che fa un angolo più ottuso e alle vene conduce più rapidamente.

Così, mentre dal punto di vista anatomico, vi sarebbe un reticolo ben distinto, risulterebbe un' indipendenza nei capillari dal punto di vista funzionale. Essi non hanno tutti eguale dilatazione, nè i corpuscoli rossi si muovono con eguale velocità, ma varia da zona a zona. Per quali vie e in qual modo poi il bleu di metilene, dal luogo di iniezione, passi all' epitelio renale, è una questione insoluta.

Il fatto da me osservato, che nel sangue circolante non se ne può vedere nè in sospensione, nè in soluzione, salvo qualche corpuscolo, probabilmente fagocitato e ossidato dai linfociti, concorda col risultato negativo delle ricerche spettroscopiche fatte appunto da varii Autori, per trovarlo nel sangue.

Se poi si riflette che nelle sedi di iniezioni, sia peritoneale, che sottocutanea, i linfatici ne sono fortemente impregnati, si potrebbe rite-

nere probabile che ridotto nel sangue, venga versato come leucoprodotto dai tubuli senza dar segni visibili del suo passaggio.

I granuli non si presentano uniformemente distribuiti in tutti i tratti di tubuli che si trovano alla superficie renale, ma si nota un alternarsi di zone provviste e zone sprovviste, tanto da far pensare che regioni in fase di attività si trovino accanto a quelle in fase di riposo. Prolungando l'osservazione, si può avere un alternarsi di siffatti periodi nella stessa zona.

Data la possibilità di ottenere risultati di un certo interesse ho in corso delle ricerche per studiare sotto diverse condizioni normali e patologiche, la funzione renale.

FIRENZE

SOCIETÀ TIPOGRAFICA FIORENTINA

33 - VIA S. GALLO - 33

1912